

Please Click here to view the drawing

(19)  KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

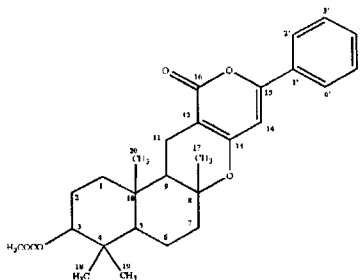
(11)Publication number: 1020030012722 A
(43)Date of publication of application: 12.02.2003(21)Application number: 1020010047130
(22)Date of filing: 04.08.2001(71)Applicant: KOREA RESEARCH
INSTITUTE OF BIOSCIENCE
AND BIOTECHNOLOGY
(72)Inventor: KIM, SEONG UK
KIM, YEONG GUK
LEE, HYEON SEON
LEE, SEUNG UNG
NOH, MUN CHEOL
SONG, HYE YEONG

(51)Int. Cl. C07D 493 /04

(54) NOVEL PHENYLPYROPENE-C, PREPARATION METHOD THEREOF AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING THE SAME

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided are novel phenylpyropene-C, a preparation method thereof using *Penicillium griseofulvum* F1959 and a pharmaceutical composition containing the same for the treatment of atherosclerosis and hyperlipidemia. CONSTITUTION: The novel phenylpyropene-C is represented by the formula(1) and produced by culturing *Penicillium griseofulvum* F1959(KCTC 0387BP), separating phenylpyropene-C from the culture broth of *Penicillium griseofulvum* F1959 and purifying it. The pharmaceutical composition contains as an active ingredient the phenylpyropene-C.



copyright KIPO 2003

Legal Status

Date of request for an examination (20010804)

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)(51) Int. Cl.⁷
C07D 493/04(45) 공고일자 2003년09월22일
(11) 등록번호 10-0399036
(24) 등록일자 2003년09월08일(21) 출원번호 10-2001-0047130 (65) 공개번호 특2003-0012722
(22) 출원일자 2001년08월04일 (43) 공개일자 2003년02월12일(73) 특허권자 한국생명공학연구원
대전 유성구 어은동 52번지(72) 발명자 김영국
대전광역시유성구어은동 한빛아파트102동601호노문철
대전광역시유성구도룡동과기원아파트2-306호이현선
대전광역시유성구어은동99한빛아파트119동703호송혜영
대전광역시중구유천동현대아파트112-1101호이승웅
대전광역시서구괴정동한신아파트104-105김성욱
대전광역시유성구어은동한빛아파트110-405호

(74) 대리인 이원희

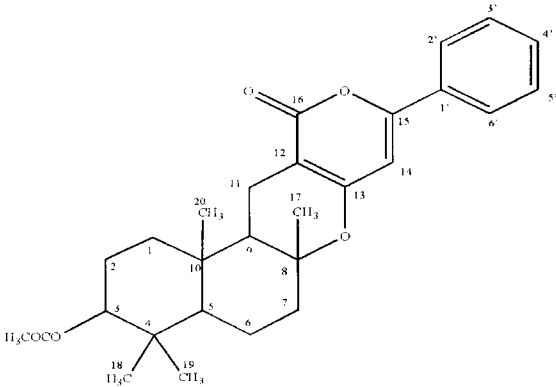
청구범위

(54) 신규한 페닐피로펜 씨, 이의 생산방법 및 이를 포함하는약학적 조성물

요지

본 발명은 신규한 페닐피로펜 씨(phenylpyropene-C), 이의 생산방법 및 이를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것으로, 좀 더 상세하게는 본 발명은 아실-코에이:콜레스테롤 아실트랜스퍼라제(ACAT, Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase) 활성저해제인 하기 **화합식 1** 로 표시되는 페닐피로펜 씨(phenylpyropene-C), 페니실리움 그리세오향(*Penicillium griseofulvum* F1959) 균주를 이용한 그의 생산방법 및 이를 포함하는 동맥경화 또는 고지혈증 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 페닐피로펜 씨는 동맥경화 병변의 진전에 관여하는 콜레스테롤에 아실기 전 이대사를 저해하고 콜레스테롤 흡수를 저해함으로 동맥경화 및 고지혈증을 비롯한 순환기질환 치료 효과를 지닌다.

화학식 1



도 1

도 5

도 6

아실-코에이:콜레스테롤 아실트랜스퍼라제(ACAT), 페닐피로펜 씨(phenyl pyropene C), 페니실리움 그리세오향범 F1959, 콜레스테롤, 동맥경화, 고지혈증, 순환기질환

도 7

도면 1 내지 7을 설명

도 1 은 본 발명의 페닐피로펜 씨를 생산하는 페니실리움 그리세오향범의 광학현미경 사진이고, 도 2 는 본 발명의 페닐피로펜 씨에 대한 수소 핵자기공명 분석 결과를 나타내는 스펙트럼이고, 도 3 은 본 발명의 페닐피로펜 씨에 대한 탄소 핵자기공명 분석 결과를 나타내는 스펙트럼이고, 도 4 는 본 발명의 페닐피로펜 씨에 대한 HMBC(Heteronuclear Multiple Bond Correlation) 분석 결과를 나타내는 스펙트럼이고, 도 5 는 본 발명의 페닐피로펜 씨의 HMBC 연관관계를 나타내는 모식도이고, 도 6 는 본 발명의 페닐피로펜 씨의 아실-코에이:콜레스테롤 아실트랜스퍼라제의 저해활성도를 나타내는 그래프이고, 도 7은 본 발명의 페닐피로펜 씨의 투여에 따른 생존율을 나타내는 그래프이다.

발명 1 내지 7을 설명

도면 1 내지 7을 설명

도면 1 내지 7을 설명

본 발명은 신규한 페닐피로펜 씨(phenylpyropene-C), 이의 생산방법 및 이를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것으로서, 좀 더 상세하게는 본 발명은 아실-코에이:콜레스테롤 아실트랜스퍼라제(ACAT, Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase) 활성저해제인 신규한 페닐피로펜 씨, 페니실리움 그리세오향범(*Penicillium griseofulvum* F1959) 균주를 이용한 그의 생산방법 및 이를 포함하는 동맥경화 또는 고지혈증 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 보건위생의 여건이 좋아지면서 전염성 질환은 줄어들었으나 순환기 질환과 암의 발병률은 계속 증가추세에 있으며, 순환기질환은 주로 고지혈증에 의하여 발병되며 이 질환의 사망률은 전체 사망률 중에서 상위를 차지하고 있으며, 그에 따른 의약품의 개발이 요구되고 있다. 고지혈증의 원인이 되는 콜레스테롤(cholesterol)은 음식물의 섭취에 의한 외인성 콜레스테롤과 생체내 합성(주로 간장)에 의한 내인성 콜레스테롤이 있다고 알려져 있다(Heider, J. G., *J. R. Prous Science Publishers*, 1986, 423-438). 이러한 콜레스테롤 혹은 중성지방의 체내유입이 지나쳐 고지혈증이 되면 혈중에 콜레스테롤이나 트리글리세라

이드(triglyceride)가 과다하게 높은 증상이 되며 동맥 경화증을 일으키는 주 요인으로 알려져 있다. 이런 증상들은 지단백질(lipoprotein)의 형성, 운반, 분해 과정 중에 이상이 생겨 지단백질의 대사가 비정상적으로 이루어지기 때문이다. 역학적 조사에 의하면 허혈성 심장질환의 대부분은 관상동맥의 아테로마성 동맥경화증이 주된 원인이고, 혈청 콜레스테롤의 상승이 병의 발생과 진전에 중요한 인자라고 알려져 있으며, 이러한 혈청 콜레스테롤을 저하시키기 위해서는 소장에서 콜레스테롤의 흡수저해, 간에서 콜레스테롤의 생합성 저해, 담즙산의 배설을 촉진시키는 방법들이 제시되고 있다(Goldstein, J. L. and S. M. Brown, *Nature*, **1990**, 33, 425-430; Komai, T. and Y. Tsujita, *DN P*, **1994**, 7, 279-288). 현재 혈청 콜레스테롤 농도를 낮추기 위하여 사용되고 있는 의약품으로는 간장에서 생합성되는 콜레스테롤의 합성을 저해하는 의약품으로 일본의 삼공, 미국의 머크(Merck)사의 제품으로 콤팩틴(compactin)의 생물학적 변형 유도체인 프라바스타틴(pravastatin)과 심바스타틴(simvastatin)이 가장 높은 점유율과 신장물을 보이고 있다. 이들 의약품의 작용 기작은 간장에서 콜레스테롤의 생합성 과정 중 합성 중간단계에 관여하는 3-하이드록시-3-메틸 글루타릴 코에이(3-hydroxy-3-methyl glutaryl Co-A, HMG Co-A) 환원효소를 저해하는 것이다. 그러나 HMG Co-A 환원효소 저해제를 장기간 사용하면 메발로네이트(mevalonate) 이후의 콜레스테롤 합성 중간단계의 부경로에서 생성되어 인체가 필요한 조효소 A(coenzyme A, ubiquinone), 돌리콜(dolichol), 헴 A(haem A), 파네실레이티드 단백질(farnesylated protein, Ras, lamin B) 및 콜레스테롤에서 생성되는 스테로이드(steroid) 호르몬, 비타민 D(vitamin D), 담즙산, 지단백질(lipoprotein)의 생산이 억제되는 부작용이 나타나는 것이 보고되었다(Grunler, J., et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1994**, 1212, 259-277). 또한, HMG Co-A 환원효소 저해제를 지속적으로 사용시 심장기능과 면역기능에 중요한 역할을 하는 조효소 Q(coenzyme Q)의 합성을 감소시키는 것으로 나타나, 동맥경화증 환자나 심장질환 환자에게는 악영향을 줄 수 있는 것으로 보고되었다(Willis, R. A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1990, 87, 8928-8930). 현재 고지혈증 치료제로는 간장에서 합성되는 콜레스테롤의 생합성을 저해하는 저해제와, 간장에서 분리되어 음식을 소화시키고 대장에서 재흡수되는 담즙산에 결합하는 음이온 교환체가 임상적으로 콜레스테롤 재흡수 저해제로 사용되고 있으나, 보다 사용에 제한사항이 없고, 작용기작이 확실하며 부작용이 적은 새로운 고지혈증 치료제의 개발이 요구되고 있다. 그 중에서도 ACAT활성 저해제가 고지혈증 예방과 치료에 효과가 있는 것으로 보고되었고(Sliskovic, D. R. and A. D. White, *Trends in Pharmacol. Sci.*, **1991**, 12, 194-199) 특히, 동맥경화 발생 기작에 직접적으로 관련되어 있는 새로운 작용기작을 갖는 고지혈증 치료제 개발의 일환으로 ACAT저해제의 개발이 추천되고 있다. ACAT는 콜레스테롤의 아실화에 관여하여 소장에서 콜레스테롤의 흡수, 간장에서 VL DL(very low density lipoprotein)의 합성, 지방세포와 혈관내벽에 저장형 콜레스테롤의 축적에 관여하는 효소로 알려져 있다.

외국의 경우 연구소, 대학, 제약업체에서 고지혈증치료제를 개발하기 위하여 수종의 탐색체계가 개발, 운용되고 있으며 그 중에 몇몇은 개발에 성공하여 큰 성과를 올리고 있는 것도 있으나, 보다 안전하고 확실한 작용기작을 갖는 고지혈증 예방치료제로 차세대약품을 개발하기 위하여 ACAT 저해제가 탐색되고 있다(Jeong, T. S., et al., **1995**, *J. Antibiotics*, 48, 751-756). 지금까지 연구되어진 ACAT 저해제들은 화학합성품이 주로 연구대상이었으며 워너(Warner)사, 람버트(Lambert)사, 화이자(Pfizer)사, 야마노치(Yamanouchi)사 등에서 우레아(urea), 아마이드(amide), 페놀(phenol)계의 합성화합물을 개발한 바 있다(Matsuda, K., *John Wiley Son, Inc.*, 1994, 271-305). 그 중에서는 *in vivo* 활성시험을 마치고 전임상단계 시험중인 의약품 후보물질도 있으나, 아직까지 ACAT저해제로 임상에 사용되고 있는 것은 없으므로, 새로운 구조를 갖는 선도물질을 개발하기 위하여 미생물 자원을 대상으로 탐색연구가 진행되었는데 일본 기타사토(Kitasato)연구소의 퍼팩틴(purpactin)의 구조가 밝혀진 것을 시작으로(Tomoda, H., et al., *J. Antibiotics*, **1991**, 44, 136-143) 일본 산쿄(Sankyo)사의 에피코리퀴논 A(epi-cohliquinone A, 일본 공개특허공보 특개평 4-334383, **1992**, 신규화합물 epi-cohliquinone A), 동경 농공대의 아카텔린(acatelin, Naganuma, S., et al., *J. Antibiotics*, **1992**, 45, 1216-1221), 헬민토스포롤(helminthosporol, Park, J. K., et al., *J. Antibiotics*, **1993**, 46, 1303-1305), 라테리틴(lateritin, Hasumi, K., et al., *J. Antibiotics*, **1993**, 46, 1782-1787), 질세틴(gypsetin, Shinohara, C., et al., *J. Antibiotics*, **1994**, 47, 163-167), 일본 기타사토(Kitasato) 연구소의 에니아틴(enniatins, Nishida, H., et al., *J. Antibiotics*, **1992**, 45, 1207-1214), 글리소프레닌(glisoprenins, Tomoda, H., et al., *J. Antibiotics*, 1992, 45, 1202-1206), 피리피로펜(pyripyropenes, Omura, S., et al., *J. Antibiotics*, **1993**, 46, 1168-1169; Kim, Y. K., et al., *J. Antibiotics*, **1994**, 47, 154-162), 테르펜돌(terpendols, Huang, X. H., et al., *J. Antibiotics*, **1995**, 48, 1-4), 일본 교와 하코(Kyowa Hakko)사의 AS-183(Kuroda, K., et al., *J. Antibiotics*, **1993**, 46, 1196-1202), AS-186(Kuroda, K., et al., *J. Antibiotics*, **1994**, 47, 16-22), 한국생명공학연구원의 GERI-BP-001 및 GERI-BP-002(Kim, Y. K., et al., *J. Antibiotics*, **1996**, 49, 31-36) 등이 보고된 바 있으나 아직까지 임상에 적용된 것은 없는 실정이다.

이에, 본 발명자들은 새로운 콜레스테롤 대사억제물질을 분리하기 위해 탐색한 결과, 경상북도 울산에서 채취한 토양에서 분리한 푸른 곰팡이속 미생물인 페니실리움 그리세오향(*Penicillium griseofulvum*)을 분리하였으며, 상기 미생물의 대사산물에서 신규 구조의 페닐피로펜 씨를 분리하고 이것이 아실-코에이:콜레스테롤 아실트랜스퍼라제의 활성을 저해하여 콜레스테롤 대사억제효과를 가진다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

본 발명의 실시예를 첨부한 도면을 참조하여 설명한다.

본 발명의 목적은 아실-코에이:콜레스테롤 아실트랜스퍼라제(ACAT, Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase) 활성저해제인 신규한 페닐피로펜 씨(phenylpyropene-C), 페니실리움 그리세오향(*Penicillium griseofulvum* F1959) 균주를 이용한 그의 생산방법 및 이를 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

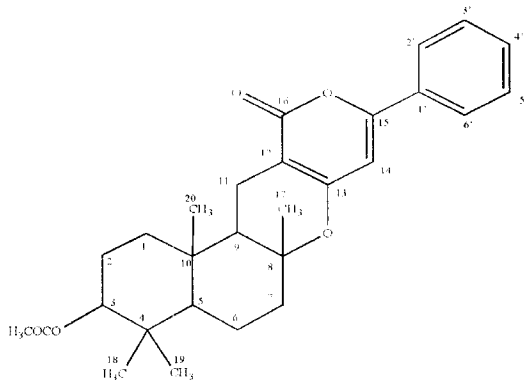
본 발명의 상세한 설명

상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 아실-코에이:콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 활성저해제인 신규한 페닐피로펜 씨 및 페니실리움 그리세오폴범(*Penicillium griseofulvum* F1959) 균주를 이용한 그의 생산방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 페닐피로펜 씨를 유효성분으로 포함하는 동맥경화 또는 고지혈증 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 아실-코에이:콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 활성저해제인 하기 **화학식 1**로 표시되는 신규한 페닐피로펜 씨(phenylpyropene-C) 및 페니실리움 그리세오폴범(*Penicillium griseofulvum* F1959) 균주를 이용한 그의 생산방법을 제공한다.

<화학식 1>



본 발명자들은 경상북도 울산에서 채취한 토양에서 생산균주를 분리하여 균학적 연구를 샘슨(Samson)의 방법(Samson, R. A., et al., *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, 1995, pp. 573-575)에 따라 수행하였다. 균주의 동정은 차팩(Czapek) 배지와 MEA 배지에 접종하여 배양하면서 관찰하였다. 형태적 관찰은 배율 400배의 광학현미경을 이용하였고, 색채의 비교는 ISCC-NBC 채색도감을 기준으로 하였다.

그 결과, 생산균주는 페니실리움 그리세오폴범(*Penicillium griseofulvum*)으로 판명되었으며 본 발명자들은 이 균주를 페니실리움 그리세오폴범 F1959로 명명하고 냉동 보관하면서 하기의 실험에 사용하였다.

본 발명자들은 상기 균주 페니실리움 그리세오폴범 F1959를 1997년 9월 25일부로 한국생명공학연구원 한국종균협회에 기탁하였다(수탁번호: KCTC 0387BP).

본 발명자들은 또한, 상기의 생산균주 페니실리움 그리세오폴범 F1959를 진탕 배양하고 배양된 발효액으로부터 활성물질들을 분리, 정제한 후 정제된 활성물질의 구조를 결정하기 위하여 자외선-가시광선 분광, 적외선 흡광, 질량분석, 핵자기공명의 기기분석을 수행하였다. 상기의 분석 결과들을 종합하여 본 발명자들은 활성물질의 구조를 결정하였고 이를 “페닐피로펜 씨”라고 명명하였다.

또한 본 발명은 상기 페닐피로펜 씨를 유효성분으로 포함하는 동맥경화 또는 고지혈증 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명자들은 본 발명의 페닐피로펜 씨의 아실-코에이:콜레스테롤 아실트랜스퍼라제(ACAT)에 대한 활성 저해 효과를 에릭슨(Ericson)의 방법을 약간 수정하여 사용하였다(Erickson, S. K., et al., *J. Lipid Res*, 1980, 21, 930-9418). ACAT 활성 효소원으로는 한국생명공학연구원 시험동물실에서 특정미생물에 오염되지 않은 실험용 흰쥐의 간으로부터 부분 정제한 마이크로솜을 사용하였으며, 기질로는 콜레스테롤(cholesterol)과 방사능으로 표지된 올레오일 코에이(oleoyl Co-A)를 반응시켜 반응생성물인 콜레스테롤 에스테르(cholesterol ester)에 포함된 방사능의 양으로 반응정도를 측정하는 방법을 이용하였다.

그 결과, 본 발명의 페닐피로펜 씨는 아실 코에이 콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 효소의 활성을 저해하는 효과가 탁월한 것으로 나타났다. 미생물 대사산물중 가장 강력한 ACAT 저해활성을 나타내는 피리피로펜 씨(pyripyropene C) 보다는 저해효과가 적었으나 피리피로펜 씨를 생산하는 균주는 아스페질러스 푸마가투스(*Aspegillus fumigatus*)로 인체에 치명적인 폐렴을 유발하는 등 아주 유해하기 때문에 활성성분을 생산하기 위한 시설은 인체방호시설이 필수적이므로 고가의 시설투자과 많은 유지비가 소요되어 산업적 생산에 이용하기에 어려운 문제가 있다. 그러나 본 발명의 ACAT 저해제인 페닐피로펜 씨는 안전성이 확보된 페니실리움 그리세오폴범이 생산하는 신규 활성물질로 소장에서 콜레스테롤의 체내 흡수를 저해하여 혈중 콜레스테롤 농도를 저하시키는데 유효하며, 간장에서 VLDL(Very Low Density Lipoprotein)의 합성을 저해하여 혈중의 LDL 콜레스테롤 저하, 혈관내의 동맥경화 병변에서 동맥경화의 진전에 관여하는 콜레스테롤 아산화물 저해하여, 고 콜레스테롤증에 기인하는 고지혈증, 동맥경화 등 각종 심혈관계질환의 예방 및 치료용 의약품으로 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명의 페닐피로펜 씨는 임상투여시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품제제의 형태로 사용될 수 있다.

즉, 본 발명의 페닐피로펜 씨는 실제 임상투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 **화학식 1**의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크

로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단 순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순회석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텔솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

본 발명의 페닐피로펜 씨의 유효용량은 10~100 mg/kg 이고, 바람직하기로는 10~30 mg/kg 이며, 하루 1~3 회 투여될 수 있다.

본 발명자들은 또한, 실험동물을 이용하여 본 발명의 페닐피로펜 씨의 *in vivo* 독성실험을 수행하였다. 활성물질을 체중이 25 g 정도의 ddY 생쥐의 복강에 200 mg/kg 용량으로 주사한 결과, 투여 30분 후 활동량이 조금 줄어들었으나, 투여 2시간 후 이런 증상이 나타나지 않았고, 투여 7일 후까지 사망하지 않았으므로, 이 물질에 대한 급성독성은 200 mg/kg 용량까지는 없는 것으로 판단되었다.

이하, 본 발명을 실시 예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시 예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시 예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 생산균주의 동정

본 발명자들은 경상북도 울산에서 채취한 토양에서 생산균주를 분리하여 균학적 연구를 샘슨(Samson)의 방법(Samson, R. A., et al., *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, 1995, pp. 573-575)에 따라 수행하였다. 균주의 동정은 차팩(Czapek)배지(DIFCO)와 MEA배지(Malt extract 2.5%, agar 1.5%, DIFCO)에 접종하여 25℃ 배양기에서 배양하면서 관찰하였다. 형태적 관찰은 배율 400배의 광학현미경을 이용하였고, 색체의 비교는 ISCC-NBC 채색도감을 기준으로 하였다.

그 결과, 차팩(Czapek)배지에서 7일간 배양한 균체는 직경이 15-20 mm이고 균체 뒷면의 색깔은 황색에서 홍갈색으로 관찰되었다. MEA배지에서 7일간 배양한 균체는 생육이 왕성하여 직경이 20-25 mm이고 황녹색으로 고밀도의 균락을 보였다. 분생포자는 일렬로 붙어있었으나 가끔은 옆으로 나온 것도 관찰되었으며 특히, 균총의 가장자리는 부드럽고 투명하였다. 분생자국은 두쪽가지에 부정형의 이중 또는 사중으로 연결되어 있었으며 가지는 다른 균들의 가지보다 특히 짧아 4.5-6.5 μ m 정도였다. 포자는 달걀형으로 그 크기는 3.0-3.5 x 2.2-2.5 μ m 정도로 측정되었다(도 1). 상기의 결과로부터 생산균주는 페니실리움 그리세오폴범(*Penicillium griseofulvum*)으로 판명되었으며 본 발명자들은 이 균주를 페니실리움 그리세오폴범 F1959로 명명하고 -80℃에서 10% 글리세롤을 첨가하여 보관하면서 하기의 실험에 사용하였다.

본 발명자들은 상기 균주 페니실리움 그리세오폴범 F1959를 1997년 9월 25일부로 한국생명공학연구원 한국종균협회에 기탁하였다(수탁번호: KCTC 0387BP).

<실시예 2> 콜레스테롤 대사억제물질의 생산 및 분리정제

본 발명자들은 냉동 보관된 상기의 생산균주 페니실리움 그리세오폴범 F1959를 방지판(baffle)이 있는 1ℓ 삼각플라스크의 멸균된 100 ml 종균배지(0.5% 포도당, 0.2% 이스트 추출물, 0.5% 폴리펩톤, 0.1% 인산칼륨, 0.05% 황산마그네슘 칠배결정수, pH 5.8)에 접종하여 29℃에서 18시간 동안 진탕 배양하였다. 배양된 종균 20 ml를 5ℓ 삼각플라스크의 멸균된 1ℓ 생산배지(2% 가용성 전분, 0.4% 소이톤, 0.3% 파마미디아, 0.1% 인산칼륨, 0.05% 황산마그네슘 칠배결정수, 0.3% 탄산칼슘, 0.2% 식염, pH 5.8)에 접종하여 29℃에서 120시간 동안 진탕 배양하였다. 배양된 발효액에 동량의 에틸 아세테이트를 첨가하여 교반추출 및 감압 농축하여 갈색유상의 조 추출물(crude extract)을 얻은 후, 실리카겔(Merck, 9385) 컬럼크로마토그래피를 통해 실리카겔 4배량의 클로로포름-메탄올액(99:1, 98:2, 97:3, 95:5, 90:10 V/V%)을 흘러 분액하여 활성이 있는 분액의 유기용매층을 얻고 이를 감압 농축하여 유상의 황갈색 물질을 얻었다. 최종적으로, 고속 액체 크로마토그래피를 사용하여 본 발명의 페닐피로펜 씨를 정제하였는데 고속 액체 크로마토그래피 칼럼으로는 와이엠씨(YMC)사의 ODS(20 x 250 mm)를 사용하였으며, 검출기는 자외선검출기를 사용하여 322 nm에서 검출하였다. 활성성분은 아세트나이트릴/물(75:25)을 용매로 하여 분당 8 ml로 용출시켰고 활성물질은 49분에 용출되었다. 분획을 감압 농축하여 완전히 정제된 활성물질은 무색의 무정형 결정으로, 활성물질의 생산량은 120시간 배양한 발효액 1ℓ 당 3.1 mg 이었다.

<실시예 3> 기기분석 및 구조결정

본 발명자들은 실시예 2에서 분리 정제된 ACAT 활성저해물질의 구조를 결정하기 위하여 자외선-가시광선 분광, 적외선 흡광, 질량분석, 핵자기공명의 기기분석을 수행하였다.

자외선-가시광선 흡광도 분석은 완전히 정제된 활성물질을 100% 메탄올에 녹여 자외선-가시광선 분광기(Shimadzu 사, UV-265)를 이용하여 흡수파장을 분석하였으며, 적외선(IR)흡광도 분석은 활성물질 시료 2 mg을 클로로포름에 녹여 AgBr 장에 바른 후 건조하여 비윌리콕 적외선 분광기(Bio-Rad Digilab Division, FTS-80)로 분석하였다. 분자량 분석은 활성물질을 VGZAB-7070 질량분석기를 이용하여 고분해능 질량분석을 수행하였으며, 핵자기공명(NMR) 분석은 활성물질 시료 10 mg을 완전히 건조시킨 후 $CDCl_3$ 에 녹여 5 mm NMR 튜브에 넣고 핵자기공명 분석기(Varian Unity-500)로 분석하였으며 1H -NMR은 500.13 MHz로, ^{13}C -NMR은 125.75 MHz로 측정하였다. 또한, DEPT와 HMQC 스펙트럼(spectrum)으로 수소와 연결된 탄소의 형태와 위치를 부분적으로 추정하였고, 1H - 1H COSY실험을 통하여 물질의 부분구조를 추정하였으며 HMBC(Heteronuclear Multiple Bond Correlation) 실험을 통하여 물질구조 중의 다른 탄소와 수소결합 형태를 추정하였다.

그 결과, 메탄올 용액에서 UV 극대값이 238 nm(208,000), 322 nm(137,000)에서 극대 흡광치를 나타냈으며, 분광 결과는 특히적으로 1740 cm^{-1} 와 1702 cm^{-1} 에서 흡수피크가 관찰되었으므로 분자구조에 COO 그룹의 존재를 추

정할 수 있었다. 질량분석 결과 분자량은 450이고, 분자식은 $C_{28}H_{34}O_5$ 로 추정되었다. 1H -NMR 결과, 방향족(aromatic) 구조에서 전형적으로 나타나는 이중체(doublet)의 7.43 ppm 양자(proton, H-2' 및 H-6')와 세 개의 양자(7.79 ppm; H-3', H-4', H-5')가 나타나는 것으로 보아 물질구조 중에 페닐(phenyl)기의 한곳이 치환된 부분구조의 존재가 추정되었다(도 2). 고 자장영역(δ 1.10 - 1.90)에서 겹쳐진 신호들로 나타나 연결된 상태를 추정할 수 없어 DSPDS(differential selective proton decoupling spectra)로 양자의 연결 상태를 추정하였는데 δ 4.51(3-H)와 δ 1.18(3-Hb)을 조사하면 δ 1.78(2-Hb)와 δ 1.68(2-Ha)의 신호가 단순화되는 것으로 보아 물질구조 중에 O-CH-CH₂-CH₂-의 부분구조가 추정되었다. HMBC 결과, 6.37(14-H)의 메틴-양자(methine proton)가 δ 99.57(C-12), δ 131.65(C-1), δ 158.38(C-15), δ 163.36(C-13)의 네 탄소와 관련 있는 것으로 나타났으므로 두 위치가 치환된 6-(1-phenyl)- α -pyrone의 존재를 추정하였다(도 4). 9-H에서 11-H 수소들은 1H-1H COSY에서 5-H(δ 1.52)의 신호들과 원거리에서 관련 신호가 나타났고, C-13(δ 17.57)은 δ 51.74(C-5)와 관련 신호가 나타났으므로 탄소의 위치가 인접해 있는 것으로 추정되었다. 1H - ^{13}C 원거리 관련 실험에서 11-H2(δ 2.53 및 2.25)는 C-13(δ 163.36), C-16(δ 164.62), C-12(δ 99.57)와 관련신호가 나타났으므로 메틸렌(methylene) 탄소가 C-12탄소에 결합되어있는 형태로 이는 물질의 부분구조 중에 디테르펜(diterpene) 구조와 알파-피론(α -pyrone)이 결합된 형태의 존재가 추정되었다. 1H - 1H COSY와 HMBC결과, C-9탄소는 >C(CH₃)CH₂CH₂CH의 부분과 결합하고 있는 것으로 추정되었으며 0.89(19-H3)의 메틸(methyl)기는 80.38(C-3), 38.00(C-4), 28.36(C-18) 탄소와 이웃하는 것으로 나타났고, 0.92(18-H3)의 메틸기는 80.38(C-3), 38.00(C-4) 탄소와 이웃하는 것으로 나타났으며, 0.95(20-H3)의 메틸기는 55.31(C-5), 51.74(C-9), 37.42(C-1), 37.03(C-10) 탄소와 이웃하는 것으로 나타났고, 1.27(17-H3)의 메틸기는 80.74(C-8), 51.74(C-9), 40.35(C-7) 탄소와 이웃하는 것으로 나타났는데 이는 물질구조에 디테르펜(diterpene)이 존재한다는 신호들이다. 또한, HMBC에서 4.51(3-H)의 옥시메틴(oxymethine)과 2.07의 메틸 양자(methyl proton)가 170.97의 카르보닐(carbonyl) 탄소와 관련이 있는 것으로 보아 아세톡시(acetoxy)의 위치를 결정하였다(도 5). 상기의 결과들을 종합하여 본 발명자들은 활성물질의 구조를 결정하고 이를 “페닐피로펜 씨”라고 명명하였다.

<실험예 1> 활성물질의 ACAT 저해효과 분석

본 발명자들은 본 발명의 페닐피로펜 씨의 아실-코에이:콜레스테롤아실트란스퍼라제(ACAT)에 대한 활성 저해효과를 에릭슨(Erickson)의 방법을 약간 수정하여 사용하였다(Erickson, S. K., et al., *J. Lipid Res*, 1980, 21, 930-9418). ACAT 활성 효소원으로는 한국생명공학연구원 시험동물실에서 특정미생물에 오염되지 않은 실험용 흰쥐의 간으로부터 부분 정제한 마이크로솜을 사용하였으며, 기질로는 콜레스테롤(cholesterol)과 방산능으로 표지된 올레오일 코에이(oleoyl Co-A)를 반응시켜 반응생성물인 콜레스테롤 에스테르(cholesterol ester)에 포함된 방산능의 양으로 반응정도를 측정하는 방법을 이용하였다. 구체적으로, 아세톤에 용해시킨 콜레스테롤과 역시 아세톤에 용해시킨 트리톤(Triton) WR-1339를 혼합하여 물에 완전히 현탁시키고 질소가스로 아세톤을 제거한 후 칼륨-인산 완충액(K-phosphate buffer, pH 7.4, 최종농도 0.1 M)을 넣고 효소반응을 안정화시키기 위하여 30 μ M의 BSA(bovine serum albumin)를 첨가한 후, DMSO로 녹인 시료를 10 μ l 씩 넣어 37°C에서 30분 동안 흔들어주면서 전 반응시킨 후, 본 반응은 기질인 [1-¹⁴C]올레오일-코에이(oleoyl-Coenzyme A)를 0.04 μ Ci가 되게 넣고 37°C에서 30분 동안 흔들어 주면서 반응시킨 후, 이소프로판올-헵탄(isopropanol-heptane) 1 ml를 넣어 반응을 정지시키고 *n*-헵탄 0.6 ml와 KPB 완충액 0.4 ml를 첨가하여 잘 섞은 후 2분 동안 정치하여 분액되면 상등액 200 μ l를 취하여 섬광계수기용 바이알(scintillation vial)에 넣고 섬광계수기용 혼합액(scintillation cocktail, Lipoluma, Lumac Co.) 4 ml를 넣어 섬광계수기(scintillation counter, Packard Delta-200)를 이용하여 생성된 콜레스테릴 올레이트(cholesteryl oleate)의 양을 측정하였으며 저해활성은 하기 계산식에 따라 계산하였다.

$$\text{저해활성(\%)} = [1 - (T - B / C - B)] \times 100$$

T: 효소 반응액에 시료를 넣어 시험구의 cpm값,

C: 효소반응액에 시료를 넣지 않은 대조구의 cpm값,

B: 효소원을 넣지 않고 시료를 넣은 대조구의 cpm값

그 결과, 본 발명의 페닐피로펜 씨는 아실 코에이 콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 효소의 활성을 50% 저해하는 농도 즉 IC₅₀가 7.2 μ g/ml로 측정되었고 활성물질의 분자량이 450이므로 IC₅₀는 16.0 μ M로 계산되었다(도 6).

<실험예 2> 활성물질의 급성독성 시험

본 발명자들은 실험동물을 이용하여 본 발명의 페닐피로펜 씨의 *in vivo* 독성실험을 수행하였다. 활성물질을 체중이 25 g 정도의 ddY 마우스의 복강에 200 mg/kg 용량으로 주사한 결과, 투여 30분 후 활동량이 조금 줄어들었으나, 투여 2시간 후 이런 증상이 나타나지 않았고, 투여 7일 후까지 사망하지 않았으므로, 이 물질에 대한 급성독성은 200 mg/kg 용량까지는 없는 것으로 판단되었다(도 7).

예제 1

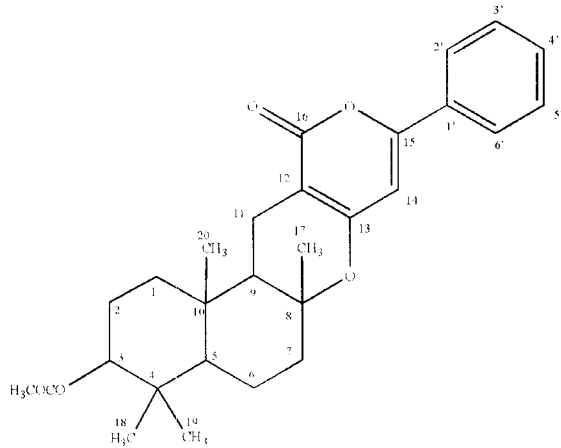
상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 페닐피로펜 씨는 동맥경화 병변의 진전에 관여하는 콜레스테롤에 아실기 전 이대사를 저해하고 콜레스테롤 흡수를 저해함으로 동맥경화 및 고지혈증을 비롯한 순환기질환 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

예제 2

청구항 1.

하기 화학식 1 로 표시되는 페닐피로펜 씨(phenylpyropene-C).

<화학식 1>



청구항 2.

페니실리움 그리세오향범(*Penicillium griseofulvum*) 균주를 배양하고 배양된 발효액으로부터 페닐피로펜 씨를 분리, 정제하는 것을 특징으로 하는 제 1항의 페닐피로펜 씨의 생산 방법.

청구항 3.

제 2항에 있어서, 균주는 페니실리움 그리세오향범(*Penicillium griseofulvum*) F1959(수탁번호: KCTC 0387BP)인 것을 특징으로 하는 생산 방법.

청구항 4.

제 1항의 페닐피로펜 씨를 유효성분으로 포함하는 동맥경화 또는 고지혈증 치료용 약학적 조성물.

도면

도면 1

